

1  
P/V

1

BACTERIES LACTIQUES TRANSFORMEES POUR LEUR CONFERER UN METABOLISME RESPIRATOIRE, ET LEVAINS COMPRENANT LESDITES BACTERIES.

La présente invention concerne l'amélioration 5 des propriétés de conservation et d'acidification des levains lactiques.

Par « levain lactique », on désigne toute préparation destinée à l'ensemencement d'un milieu à fermenter, et comprenant au moins une souche de bactéries 10 lactiques appartenant notamment à l'un des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria*, ou *Bifidobacteria*, ou un mélange de souches appartenant à un ou plusieurs des genres mentionnés ci-dessus.

15 Les levains lactiques utilisés notamment pour produire des aliments fermentés et des produits d'ensilage sont habituellement préparés en culture par lots, et sont ensuite concentrés et conditionnés pour une utilisation ultérieure afin d'inoculer différents 20 produits alimentaires en vue de leur fermentation. L'une des préoccupations des producteurs de levains est d'obtenir une biomasse bactérienne importante, et de maintenir une bonne viabilité des bactéries pendant le stockage afin que, lors de l'inoculation, la fermentation 25 démarre rapidement et donne des produits alimentaires possédant des caractéristiques reproductibles.

Or, de nombreuses causes de stress peuvent intervenir lors des différentes étapes de préparation des levains et altérer la survie des bactéries lactiques. En 30 particulier, la viabilité bactérienne peut être rapidement perdue si les cultures sont maintenues en phase stationnaire. L'une des causes en est l'accumulation dans le milieu de produits naturels du métabolisme bactérien, notamment des acides organiques 35 comme l'acide lactique qui entraînent une diminution de pH préjudiciable à la croissance bactérienne. Une autre

cause de perte de viabilité pendant la préparation et le stockage est la présence d'oxygène, qui est naturellement toxique pour les bactéries lactiques ; ces bactéries ont en effet en commun un métabolisme des hydrates de carbone 5 basé sur la fermentation. BERGEY'S manuel, 9<sup>ème</sup> édition, édité par HOLT et al. (1994) WILLIAMS et WILKINS Eds.

Pour limiter la baisse de pH, on utilise habituellement pour la production de levains de bactéries lactiques, des milieux de culture tamponnés autour de 10 pH 6 avec des cations associés à des carbonates, des hydroxydes, des phosphates ou des oxydes. Cependant, ces apports dans le milieu de culture peuvent entraîner des problèmes pour les productions ultérieures, par exemple en favorisant le développement de phages, ou en 15 augmentant la solubilité des caséines.

Pour éviter les effets toxiques de l'oxygène, la préparation et le stockage des levains sont habituellement effectués en anaérobiose ; par exemple, pendant la préparation des cultures de levains par lots, 20 certaines étapes sont effectuées sous azote, afin d'éliminer les traces d'oxygène. Cependant, lors de l'utilisation des levains, ceux-ci sont fréquemment mis en présence de niveaux élevés d'oxygène. Par exemple, le lait qui est utilisé pour la préparation des produits 25 laitiers fermentés est fortement aéré pendant les processus de transfert et donc riche en oxygène. Ceci pourrait constituer une cause de ralentissement du redémarrage des levains.

Il a été rapporté [A.K. SIJPESTEIJN, Antonie von Leeuwenhoek 36 :335, 1970] que des *Lactococcus* et 30 *Leuconostoc* cultivés en présence d'hème et sous aération produisent des cytochromes et possèdent un métabolisme respiratoire.

Des travaux plus récents [KANEKO et al. Appl. 35 Environ. Microbiol., 56 :9, 2644-2649 (1990)], font état d'une amélioration de la prolifération d'une souche de

*Lactococcus lactis diacetylactis*, cultivée en présence d'hémine et/ou de Cu<sup>2+</sup>. Ces auteurs n'ont pas attribué cet effet à l'apparition d'un métabolisme respiratoire, mais à l'activation de la diacétyl-synthase par l'hémine et/ou le Cu<sup>2+</sup>, ce qui orienterait préférentiellement le métabolisme fermentaire vers la production de diacétyle, au détriment du lactate.

L'équipe des Inventeurs a récemment découvert que dans le cadre de la préparation de levains lactiques, l'utilisation d'un composé porphyrique associé à une culture en aérobiose permettait d'obtenir une croissance bactérienne plus importante que celle obtenue lors des procédés classiques, et qu'en outre, le pourcentage de bactéries viables dans la population bactérienne et la durée de la survie étaient également beaucoup plus importants. Qui plus est, lorsque les levains obtenus de la sorte sont utilisés pour inoculer un produit à fermenter, on observe un redémarrage très rapide de la croissance et de la fermentation bactérienne, se traduisant par une acidification du produit beaucoup plus rapide que celle observée avec des levains classiques. Ces travaux sont décrits dans la Demande Internationale PCT/IB99/01430 (PCT WO 00/05342) au nom de l'INRA.

Les Inventeurs ont maintenant montré que les améliorations du rendement bactérien et de la viabilité pendant le stockage étaient dues à l'acquisition d'un métabolisme respiratoire par *L. lactis* lors de la culture sous aération et en présence d'un composé porphyrique. Lors de l'inoculation du produit à fermenter, les bactéries sont en outre capables de restaurer immédiatement un métabolisme fermentaire, ce qui se traduit par l'augmentation des performances de redémarrage.

Le métabolisme respiratoire nécessite la présence de l'équipement enzymatique impliqué dans différentes voies métaboliques, notamment la synthèse et

l'utilisation d'hème, la synthèse de cytochromes, et probablement la synthèse d'au moins une partie du cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs).

En utilisant des amorces dérivées de l'alignement de séquences de gènes connus comme impliqués dans la respiration chez d'autres bactéries, les Inventeurs ont recherché la présence de gènes homologues chez *L. lactis*. Ils ont ainsi identifié trois gènes codant respectivement pour la ferrochélatase (enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'hème en catalysant la formation d'un complexe entre le fer et un composé porphyrique précurseur de l'hème, le complexe ainsi formé pouvant être incorporé dans les cytochromes bactériens), la cytochrome D oxydase (une hémoprotéine nécessaire pour la respiration), et l'aconitase (enzyme intervenant dans le cycle de Krebs).

Ils ont en outre montré que les gènes codant la cytochrome D oxydase et la ferrochélatase étaient fonctionnels chez *L. lactis*. Ils ont en effet constaté que des bactéries dans lesquelles le gène de la cytochrome D oxydase est inactivé ne présentent plus de métabolisme respiratoire lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose et en présence d'un composé porphyrique contenant du fer. De même, ils ont observé que l'inactivation du gène codant la ferrochélatase entraînait la perte des capacités de métabolisme respiratoire de *L. lactis* dans le cas de cultures effectuées en présence d'un composé porphyrique ne contenant pas de fer, tel que la protoporphyrine, mais pas dans le cas de cultures effectuées en présence d'un composé porphyrique contenant du fer, tel que l'hème.

Ces observations confirment que l'amélioration des performances des levains lactiques obtenue en préparant ces levains en aérobiose et en présence d'un composé porphyrique, décrite dans la Demande

PCT/IB99/01430, est liée à l'apparition d'un métabolisme respiratoire dans ces conditions de culture.

Les résultats des inventeurs démontrent notamment que les bactéries lactiques, représentées par 5 *L. lactis*, possèdent la capacité de croître via un mécanisme fermentaire ou respiratoire.

Le mode de croissance dépend des conditions de culture, mais aussi des signaux transmis par la cellule elle-même. La métabolisme semble plutôt fermentaire au 10 début de la croissance, puis devient respiratoire une fois que les bactéries sont en croissance exponentielle tardive. Les Inventeurs ont en outre émis l'hypothèse qu'il existait une régulation de cette transition exercée par la bactérie, et qu'une altération de cette 15 régulation, effectuée par l'inactivation ou par la sur-expression d'un gène régulateur qui contrôle la transition entre croissance fermentaire et respiratoire, peut avoir comme résultat une respiration plus efficace.

La présente invention a pour but de fournir 20 des moyens de conférer un métabolisme respiratoire à des bactéries lactiques, ou de favoriser celui-ci, notamment afin d'améliorer les performances des levains lactiques de manière comparable à celle observée précédemment lors de l'addition d'hème (ou d'autres molécules dérivées des 25 porphyrines).

Conformément à la présente invention, ce but peut être atteint en provoquant ou en favorisant l'expression, chez une bactérie lactique d'au moins une protéine participant à ce métabolisme, par modification 30 du profil génomique de la bactérie lactique, soit en transférant chez une bactérie lactique un ou plusieurs des gènes du métabolisme respiratoire, clonés à partir d'une bactérie aérobie, soit en inactivant ou sur-exprimant un gène de la bactérie de départ, afin de 35 basculer le métabolisme vers la voie respiratoire.

La présente invention a pour objet une bactérie lactique modifiée génétiquement afin de lui conférer un métabolisme respiratoire, ou d'activer ledit métabolisme.

5 Ceci englobe notamment toute bactérie lactique ayant subi au moins une modification consistant en l'addition d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire ou favorisant ledit métabolisme, et/ou au moins une  
10 modification résultant en l'activation d'au moins une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire ou favorisant ledit métabolisme, et/ou au moins une modification résultant en la sur-expression d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le  
15 métabolisme respiratoire ou favorisant ledit métabolisme, et/ou au moins une modification résultant en l'inactivation totale ou partielle, d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme fermentaire ou favorisant ledit métabolisme, et/ou au  
20 moins une modification résultant en la sous-expression, d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme fermentaire ou favorisant ledit métabolisme.

Une modification résultant en l'addition d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire, ou le favorisant, peut être obtenue en transformant ladite bactérie lactique par au moins un gène hétérologue (c'est-à-dire un gène qui n'est pas présent naturellement dans ladite bactérie), impliqué dans le métabolisme respiratoire. Il peut s'agir en particulier d'un gène issu d'une bactérie aérobie et impliqué dans le métabolisme respiratoire. Ledit gène peut notamment être choisi parmi :

35 - les gènes codant pour des protéines de la voie de biosynthèse de l'hème ;

- les gènes codant pour des protéines de la voie de biosynthèse des cytochromes ;
- les gènes codant pour des protéines héminiques ;

5 - les gènes codant pour des protéines du cycle de Krebs.

Une modification résultant en la suractivation d'une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire ou le favorisant, peut par exemple être obtenue par introduction, dans le gène codant cette protéine, d'une mutation résultant en une protéine plus active. Une modification résultant en la surexpression d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire, ou le favorisant, peut par exemple être obtenue en transformant ladite bactérie lactique par au moins une copie supplémentaire dudit gène, et/ou en agissant sur la régulation en *cis* ou en *trans* de ce gène, par exemple en plaçant ledit gène sous contrôle d'éléments de régulation de l'expression permettant une expression plus importante (par exemple promoteur fort, promoteur constitutif, amplificateur de transcription, etc.) et/ou en inactivant des éléments de régulation négative de l'expression associés audit gène (par exemple répresseur, atténuateur, etc.).

25 Par exemple, on peut ainsi suractiver et/ou surexprimer un ou plusieurs gènes choisis parmi :

- des gènes régulateurs des voies métaboliques favorisant la voie respiratoire ;
- des enzymes de la voie de biosynthèse des cytochromes ;
- des gènes codant pour des protéines héminiques.

35 Une modification résultant en l'inactivation, totale ou partielle, d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme fermentaire, ou le favorisant, peut être obtenue notamment par délétion

de tout ou partie dudit gène, ou par introduction d'une mutation résultant en la production d'une protéine moins active ou inactive. Une modification résultant en la sous-expression d'au moins un gène codant pour une 5 protéine intervenant dans le métabolisme fermentaire, ou le favorisant, peut par exemple être obtenue en agissant sur la régulation en *cis* ou en *trans* de ce gène, par exemple en plaçant ledit gène sous contrôle d'éléments de régulation négative de l'expression (par exemple répresseur, atténuateur, etc.) et/ou en inactivant partiellement ou totalement, les éléments de régulation positive de l'expression (par exemple promoteur, amplificateur de transcription, etc.), associés audit gène, ou en rendant cette expression inductible.

15 A titre d'exemple non-limitatif d'activation ou de sur-expression d'un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire, ou le favorisant, on citera notamment :

20 - une activation d'un ou plusieurs gènes intervenant dans l'assimilation de l'hème, où une modification augmentant l'expression dudit ou desdits gènes et/ou la rendant constitutive.

25 Ceci permet l'obtention d'une souche ayant une assimilation de l'hème plus précoce et/ou plus efficace, ce qui est souhaitable dans les cas où la disponibilité de l'hème constitue une étape limitante pour un métabolisme respiratoire.

30 Dans ce cas, la commutation entre un métabolisme fermentaire et un métabolisme respiratoire peut être contrôlée par modification de la teneur en oxygène du milieu de culture et par la présence d'hème.

35 Des exemples non-limitatifs d'inactivation ou de sous-expression de gènes codant pour des protéines intervenant dans le métabolisme fermentaire, ou le favorisant sont notamment :

- une inactivation du gène *ccpA*, ou une modification atténuant son expression ou la rendant inductible. Le gène *ccpA* régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le catabolisme des sucres [LUESINK et al., Molecular Microbiology 30 : 789-798, (1998)]. Les Inventeurs ont émis l'hypothèse que son inactivation pourrait favoriser l'expression des gènes nécessaires à la respiration.

- une inactivation du gène *gls24* ou une modification atténuant son expression ou la rendant inductible. Une étude chez *Enterococcus faecalis* décrit le gène *gls24*, qui réprime l'expression des gènes codant la L-lactate déshydrogénase, la lipoamide déshydrogénase, et la pyruvate décarboxylase, dont tout sont impliquées dans le métabolisme [GIARD et al. J. Bacteriol. 182 : 4512-4520, (2000)]. Un gène analogue à *gls24* existe chez *L. lactis*. Les Inventeurs ont émis l'hypothèse qu'un mutant de *L. lactis* où *gls24* est inactivé pourrait être avantage vis à vis de la respiration.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite bactérie lactique est choisie parmi les bactéries des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria*, ou *Bifidobacteria*. Des bactéries préférées sont celles des différentes espèces du genre *Lactococcus*, ainsi que des streptocoques de l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

Pour une espèce bactérienne donnée, le ou les gène(s) approprié(s) pour conférer aux bactéries tout ou partie de l'équipement enzymatique nécessaire à l'acquisition d'un métabolisme respiratoire ou pour améliorer la respiration peuvent être pour certains gènes identifiés par l'homme du métier à partir de l'information sur les séquences des génomes bactériens disponible sur les bases de données, qui permet d'identifier les gènes déjà présents dans un

microorganisme donné et les voies métaboliques auxquelles peuvent participer ces gènes. A défaut de la séquence génomique de l'espèce bactérienne d'intérêt, la ou les séquence(s) d'une ou plusieurs espèces voisine est (sont) utilisable(s) pour déterminer quels gènes sont probablement présents. Par exemple, les séquences complètes ou quasi complètes du génome de plusieurs espèces de streptocoques (*Streptococcus mutans* et *Enterococcus* [précédemment *Streptococcus*] *faecalis*), ainsi que d'autres bactéries à gram positif sont actuellement disponibles, et révèlent la présence de plusieurs des gènes requis pour la respiration. Ces espèces sont assez proches phylogénétiquement de bactéries lactiques couramment utilisées dans l'industrie alimentaire telles que les streptocoques thermophiles, et sont également apparentées aux lactocoques.

Ainsi, la transformation de bactéries de l'espèce *Lactococcus* ou *Streptococcus* par un ou plusieurs gène(s) codant pour une ou plusieurs protéine(s) de la voie de biosynthèse de l'hème peut permettre d'obtenir des bactéries possédant un métabolisme respiratoire sans qu'il soit nécessaire d'ajouter de dérivés porphyriniques au milieu de culture.

Les gènes souhaités peuvent être obtenus à partir d'une bactérie aérobiose stricte, ou d'une bactérie aérobiose facultative. Ils peuvent aisément être identifiés à partir des génomes bactériens disponibles sur les bases de données. Par exemple, on peut utiliser des gènes obtenus à partir de *Bacillus subtilis*, qui est une bactérie aérobiose, et dont la séquence génomique complète a été publiée.

On peut ainsi apporter à une bactérie lactique la totalité des gènes nécessaires pour conférer un métabolisme respiratoire. On peut également, si on le souhaite, n'apporter qu'une partie de ces gènes, par exemple afin d'être en mesure de contrôler de différentes

manières les conditions dans lesquelles la bactérie sera capable de respirer.

On peut ainsi construire, à titre d'exemples non-limitatifs :

5 - une bactérie lactique possédant la totalité des gènes nécessaires au métabolisme respiratoire ; la commutation entre un métabolisme fermentaire et un métabolisme respiratoire peut être contrôlée par modification de la teneur en oxygène du milieu de  
10 culture ;

- une bactérie lactique possédant la totalité des gènes codant les protéines du cycle de Krebs et la totalité des gènes des cytochromes, mais dépourvue de tout ou partie des gènes de la voie de biosynthèse de  
15 l'hème ; la commutation d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire, nécessitera alors, outre l'aération du milieu, l'addition d'hème ou de l'un de ses précurseurs.

Pour l'obtention d'une bactérie lactique transformée conforme à l'invention, le ou les gène(s) souhaité(s) peuvent être introduits séparément, ou au moins une partie d'entre eux peut être regroupée en un ou plusieurs opéron(s).

Par exemple, pour conférer à *L. lactis* une capacité totale ou partielle de biosynthèse de l'hème, on peut transférer dans *L. lactis* l'un ou les deux opérons de l'hème de *B. subtilis* ou bien seulement certains des gènes présents sur ces opérons.

Pour obtenir des bactéries lactiques conformes à l'invention on peut aussi favoriser l'expression de gènes intervenant dans le métabolisme respiratoire naturellement déjà présents chez lesdites bactéries. Ceci peut être effectué par exemple en agissant sur la régulation en *cis* ou en *trans* de l'activité de ces gènes.

35 Outre les modifications génétiques, mentionnées ci-dessus, permettant de leur conférer un

métabolisme respiratoire, ou de favoriser ledit métabolisme, les bactéries lactiques conformes à l'invention peuvent comprendre en outre d'autres modifications, notamment l'introduction d'une ou 5 plusieurs séquences d'acide nucléique leur permettant la production de substances d'intérêt.

Des bactéries lactiques conformes à l'invention peuvent être obtenues en mettant en œuvre des techniques classiques de génie génétique, connues en 10 elles-mêmes de l'homme de l'art.

Pour le clonage des gènes, le ou les gènes souhaités peuvent être associés à des séquences de contrôle de la transcription et de la traduction fonctionnelles dans la bactérie lactique que l'on 15 souhaite transformer. On peut notamment, si on le souhaite, placer un ou plusieurs des gènes transférés sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur inductible, afin de permettre le contrôle de la commutation entre 20 métabolisme fermentaire et métabolisme respiratoire.

Les constructions réalisées sont placées dans un vecteur approprié pour les introduire dans la bactérie lactique concernée. Des vecteurs utilisables pour transformer des bactéries lactiques de différentes espèces, et permettant soit de maintenir l'information 25 génétique introduite sous forme d'un réplicon indépendant stable, soit de l'intégrer au chromosome bactérien, sont connus en eux-mêmes. L'intégration au chromosome bactérien peut notamment s'effectuer par transposition, ou par une méthode de remplacement de gènes par 30 recombinaison homologue, selon des méthodes connues en elles-mêmes de l'homme de l'art. A titre d'exemples non limitatifs de méthodes utilisables et de vecteurs permettant la mise en œuvre de ces méthodes, on citera notamment les méthodes et vecteurs décrits dans la 35 Demande PCT WO 93/18164 au nom de l'INRA.

Dans les cas où la quantité d'information génétique à transférer nécessite l'introduction de grands segments d'ADN, on peut utiliser les techniques de fusion de protoplastes ou de conjugaison bactérienne.

5 Des bactéries lactiques conformes à l'invention peuvent également être produites par sélection de mutants, naturels ou obtenus par mutagénèse aléatoire, chez lesquels l'activité et/ou l'expression d'une protéine intervenant dans le métabolisme  
10 fermentaire, ou le favorisant, est réduite ou inexistante, ou bien de la sélection des mutants chez lesquels l'activité et/ou l'expression d'une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire, est augmentée.

15 Le fonctionnement du métabolisme respiratoire chez la bactérie modifiée conforme à l'invention peut être vérifié en effectuant la culture de ladite bactérie dans des conditions permettant l'induction d'un métabolisme respiratoire (c'est à dire sous aération, et  
20 éventuellement, en conditions d'induction d'un ou plusieurs promoteurs inducibles contrôlant éventuellement l'expression d'un ou plusieurs des gènes transférés et/ou en présence d'hème ou de l'un de ses précurseurs dans le cas où la bactérie transformée ne  
25 comprend pas la totalité des gènes de la voie de biosynthèse de l'hème, etc.), et en mesurant les paramètres suivants : i) le pH de la culture finale, ii)  
les produits consommés ou formés pendant la durée de la culture (par exemple l'oxygène consommé, la production de fumarate ou celle de lactate, la quantité de carbone totale en fin de culture, qui permet notamment d'évaluer la production de CO<sub>2</sub> pendant la respiration, etc.), iii)  
la population bactérienne en fin de croissance, iv) la survie pendant un stockage long, et v) les propriétés de  
30 ré-acidification lorsque la souche transformée est utilisée comme levain (démarreur de culture) pour une  
35

fermentation. Si on le souhaite, une détection d'hème au sein des cellules, ou de l'activité des protéines nécessitant l'hème pour fonctionner (comme par exemple les cytochromes), peut être réalisée.

5 Des souches de bactéries lactiques modifiées conformes à l'invention, lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose, présentent une croissance importante, ce qui permet de proposer leur utilisation comme cellules-hôtes dans le cadre des procédés classiques de production de 10 substances d'intérêt par génie génétique.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de culture de bactéries lactiques, caractérisé en ce qu'il comprend la culture d'au moins une souche de bactérie lactique conforme à l'invention en conditions 15 permettant l'induction d'un métabolisme respiratoire chez ladite souche.

Lesdites conditions d'induction du métabolisme respiratoire comprennent l'aération de la culture ; avantageusement, cette aération est effectuée de manière 20 à maintenir, pendant toute la durée de la culture, un apport en oxygène égal à au moins 5 millimoles par litre de milieu de culture.

Selon les caractéristiques de la souche conforme à l'invention utilisée, et notamment selon sa 25 capacité à assimiler l'hème, ou à en effectuer la biosynthèse, lesdites conditions d'induction du métabolisme respiratoire peuvent également comprendre l'addition d'un dérivé porphyrique au milieu de culture, comme décrit dans la Demande PCT/IB99/01430.

30 Très avantageusement, les souches de bactéries lactiques conformes à l'invention peuvent être utilisées pour l'obtention de levains lactiques.

Dans ce cas, le procédé conforme à l'invention comprend en outre la récolte des bactéries à l'issue de 35 ladite culture, et éventuellement, leur conditionnement et leur conservation, par tous moyens appropriés.

La récolte des bactéries peut être effectuée par tous moyens connus en eux-mêmes ; on peut par exemple répartir la culture dans des conditionnements appropriés et la conserver sous cette forme jusqu'à utilisation ; 5 généralement, on préférera toutefois séparer les bactéries du milieu de culture et les concentrer par centrifugation ou par filtration. Les bactéries récoltées peuvent ensuite être conditionnées en vue de leur conservation.

10 La présente invention englobe également les levains lactiques comprenant au moins une souche de bactérie lactique modifiée conforme à l'invention, et notamment, des levains susceptibles d'être obtenus par le procédé conforme à l'invention.

15 Ces levains peuvent également comprendre une ou plusieurs autres souches bactériennes, d'une même espèce ou d'espèces différentes. Plusieurs espèces ou plusieurs souches différentes peuvent avoir été cultivées simultanément (dans le cas où leurs conditions optimales 20 de croissance sont compatibles), ou bien cultivées séparément et réunies après la récolte.

Les levains lactiques conformes à l'invention peuvent être récoltés et conservés dans les mêmes conditions que les levains lactiques de l'art antérieur, 25 et notamment que les levains lactiques qui font l'objet de la Demande PCT/IB99/01430 ; ils possèdent des propriétés de conservation et de redémarrage au moins comparables à celles de ces derniers.

L'invention englobe également l'utilisation 30 des levains lactiques conformes à l'invention pour l'obtention de produits fermentés. En particulier, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'un produit fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend l'ensemencement d'un milieu à fermenter à l'aide d'un 35 levain lactique conforme à l'invention.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs d'obtention de bactéries lactiques conformes à l'invention.

5 **EXAMPLE 1 : OBTENTION D'UNE SOUCHE DE *L. LACTIS* EXPRIMANT LES GENES NECESSAIRES POUR PRODUIRE DU PROTOHEME IX**

Les gènes *hemA* (NADP(H):glutamyl-tRNA reductase, numéro d'accès SWISS-PROT : P16618), *hemL* (GSA 2,1-aminotransférase, numéro d'accès SWISS-PROT : P30949), *hemB* (Porphobilinogen synthase, numéro d'accès SWISS-PROT : P30950), *hemC* (Hydroxymethylbilane synthase, numéro d'accès SWISS-PROT : P16616), *hemD* (Uroporphyrinogène III synthase, numéro d'accès SWISS-PROT : P21248), et *hemE* (Uroporphyrinogène decarboxylase, numéro d'accès SWISS-PROT : P32395), *hemY* (fonctions Coproporphyrinogène III oxydase et Protoporphyrinogène oxydase numéro d'accès SWISS-PROT : P32397) et *hemH* (ferrochélatase, numéro d'accès SWISS-PROT : P32396) de *Bacillus subtilis* permettent la synthèse du protohème IX à partir du glutamyl-tRNA.

Les gènes *hemACDBL* contenus dans un seul opéron chez *B. subtilis* sont amplifiés par PCR à partir de la souche 3G18 (pLUG1301) [HANSSON ET HEDERSTEDT, J. Bacteriol., 174(24) : 8081, (1992)] en utilisant des amorces permettant d'obtenir la séquence codante des gènes avec le promoteur, le site de fixation des ribosomes et le terminateur :

Amorce sens :

5'-GGGGAGCTCGGTATTGTCAATAGGAATGC-3'

30 Amorce antisens :

5'-GGGGATCCGTGGGAGAGCACGAAAAA-3'.

L'amplification [5 mn 96°C, (30 s. 96°C, 1 mn. 55°C, 5 mn 72°C) 30 fois] est effectuée avec 5 unités de Taq polymérase haute fidélité (Promega) en présence de 35 4 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Un fragment de 6500 pb est obtenu. Ce fragment

est ensuite cloné sur le plasmide pCR-TOPO (INVITROGEN) dans la souche *E. coli* TOP10 (INVITROGEN). Le plasmide obtenu, dénommé pTHem1, est digéré par *SpeI* et traité par l'ADN polymerase, fragment de Klenow, afin d'obtenir un bout franc. Le plasmide pTHem1 est ensuite digéré par *SacI* et le fragment *hemAXCDBL* est purifié. Il est intégré au plasmide pIL252 préalablement digéré par *XhoI*, traité à la Klenow puis par *SacI*. [SIMON ET CHOPIN, Biochimie, 70 : 559-566, (1988)]. Le plasmide résultant dénommé pILHem1 est introduit dans la souche de *L. lactis* MG1363 [GASSON, J. Bacteriol., 154 : 1-9, (1983)]. La production d'uroporphyrinogène III par cette souche est déterminée comme précédemment décrit par ANDERSON et IVANOVICS, [J. Gen. Microbiol., 49 : 31-40, (1967)].

Les gènes *hemEHY* contenus dans un seul opéron chez *B. subtilis* sont amplifiés par PCR à partir de la souche 3G18 (pLUG1301) en utilisant des amorces permettant d'obtenir la séquence codante des gènes avec ou sans le promoteur, avec le site de fixation, des ribosomes et le terminateur :  
amorce sens :

5'-GGGATCCGTATGAAAGGTGGAAATC-3', sans promoteur

5'-GGGGATCCGGCGATTTTGAACTTGAGCTACA-3', avec promoteur  
amorce antisens :

25 5'-GGGCTCGAGACACAATATTGCCATTGCACATC-3'.

L'amplification [5 mn 96°C, (30 s. 96°C, 1 mn. 55°C, 5 mn 72°C) 30 fois] est effectuée avec 5 unités de Taq polymérase haute fidélité (Promega) en présence de 4 mM de MgCl<sub>2</sub>. Un fragment de 3600 pb est obtenu. Ce fragment se révèle inclonable dans les systèmes de clonage utilisés chez *E. coli* ou chez *L. lactis*. Ceci peut être dû, d'après la littérature à la toxicité du produit de gène *hemY* chez *E. coli*. Par extension, il n'est pas exclu que HemY soit aussi toxique chez *L. lactis*.

Les gènes *hemEH* contenus dans l'opéron *hemEHY*

chez *B. subtilis* sont amplifiés par PCR à partir de la souche 3G18 (pLUG1301) en utilisant des amorces permettant d'obtenir la séquence codante des gènes avec le site de fixation des ribosomes.

5 amorce sens :

5'-GGGGTACCTCTAGACCGTATGAAAGGTGGAAATCAG-3'

amorce antisens :

5'-CCATCGATTTAACGTCCTAATTTTTAATAC

10 Ce fragment est ensuite cloné sur le plasmide pCR-TOPO (INVITROGEN) dans la souche *E. coli* TOP10 (INVITROGEN). Le plasmide obtenu, dénommé pTHem4, est linéarisé par *Xba*I, puis les extrémités sont rendues franches par le fragment Klenow de l'ADN polymerase. Le 15 plasmide pTHem4 est ensuite digéré par *Cla*I et le fragment *hemEH* est purifié. Ce fragment est ensuite placé sous la dépendance du promoteur *P<sub>nis</sub>*, inductible à la nisine (système NICE, brevet EP0712935 de VOS et KUIPERS) sur un plasmide dérivé de pNZ8020 préalablement coupé par *Bam*HI, traité à la polymérase de Klenow, puis coupé par 20 *Cla*I. Le plasmide résultant dénommé pGHem1 est introduit dans la souche de *L. lactis* NZ9000 contenant le plasmide pILHem1. La production de protohème IX par cette souche 25 est déterminée comme décrit par SHIBATA, [Methods of biochemical analysis, D. Glick (Ed.), Interscience, New York, Vol. VII, 77-109, (1959)].

Les opérons *hemACDBL* et *hemEH* sont utilisés pour complémenter des mutants correspondants de *B. subtilis* (Bacillus Genetic Stock Center) afin de s'assurer de leur fonctionnalité.

30 Les souches obtenues sont testées pour leur capacité à respirer de façon autonome dans des conditions de culture en aération, avec ou sans hémine et en induisant l'expression de l'opéron *hemEH* à la nisine. La souche utilisée en contrôle négatif est une souche NZ9000 35 contenant les plasmides vecteurs seuls respectivement pIL252 et pGK:CmR:*P<sub>nis</sub>*. La densité optique des cultures

est suivie à 600 nm. En condition d'aération, avec hémine, les valeurs de DO<sub>600</sub> obtenues sont de 2,87 pour le contrôle négatif et de 3,23 pour la souche contenant les gènes *hem*. Sans hémine, les valeurs sont de 2,10 pour le 5 contrôle négatif et 2,78 pour la souche contenant les gènes *hem*. Ces résultats montrent que l'introduction des gènes *hemA*, *hemL*, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE* et *hemH* de *B. subtilis* chez *L. lactis* semble suffisante pour assurer la biosynthèse d'hème et aboutir à un phénotype partiel de 10 respiration.

Les résultats obtenus lors du suivi de la croissance de la souche de *L. lactis* contenant les gènes *hemA*, *hemL*, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE* et *hemH* de *B. subtilis*, comparée à une souche contrôle, sont 15 récapitulés dans le Tableau I ci-dessous.

Tableau I

Conditions de culture	Densité optique A <sub>600</sub> (biomasse)	
	Contrôle (sans gènes <i>hem</i> ) : <i>L. lactis</i> NZ9000 (pIL252 ; pGK :CmR :P <sub>nis</sub> )	Gènes <i>hem</i> clonés : <i>L. lactis</i> NZ9000 (pILHem1 ; pGHem1)
Aération, nisine Sans hémine	2.1	2.8
Aération nisine Plus hémine	2.9	3.2

#### EXEMPLE 2 : CRIBLAGE POUR L'ISOLEMENT D'UNE SOUCHE DE *L. LACTIS* AYANT UNE MEILLEURE CAPACITE DE RESPIRER.

La respiration de *L. lactis* repose notamment 20 sur la capacité de la cellule à assimiler l'hémine, un cofacteur essentiel de l'activité respiratoire. D'après les travaux de KAY et al. [J. Bacteriol. 164 :1332-1336, (1985)] et ISHIGURO et al. [J Bacteriol. 164 :1233-1237, (1985)], les bactéries qui accumulent l'hémine sont aussi 25 capables de fixer un colorant, le rouge congo. L'utilisation du rouge congo permet d'isoler des souches fixant le colorant plus ou moins bien que le témoin.

Une mutagénèse aléatoire est réalisée sur la souche *L. lactis* MG1363 selon la procédure de MAGUIN et 30 al. [J. Bacteriol., 178 :931-935, (1996)]. Les cellules

sont étalées sur boîte contenant du rouge congo à 30 µg/ml. La souche mère est utilisée comme témoin.

Des mutants blancs (fixant moins le colorant) sont isolés. Ces mutants assimilent l'hémine moins efficacement que le témoin et sont défectueux pour la respiration.

Des mutants plus rouges que le témoin sont également isolés. Ces mutants possédant plus de facilité à assimiler l'hémine, seront potentiellement plus aptes à respirer que le témoin.

Les gènes mutés peuvent ensuite être identifiés par des techniques connues de l'homme de l'Art par exemple, selon la procédure de MAGUIN et al. [J. Bacteriol., 178 :931-935, (1996)].

#### **15 EXEMPLE 3 : OBTENTION D'UNE SOUCHE DE *L. LACTIS* EXPRIMANT LES GENES NECESSAIRES POUR PRODUIRE DES QUINONES.**

L'addition de la vitamine B2 (riboflavine) dans le milieu M17 glucose, peut stimuler la respiration de *L. lactis* MG1363 (augmentation de la biomasse). Dans cette optique, on peut augmenter la biomasse en respiration par la production de vitamine K2 (ménaquinone). Cette vitamine est également un élément essentiel des chaînes respiratoires. En se basant sur la séquence chromosomique de IL1403, proche de MG1363, on s'aperçoit que certains gènes sont absents par rapport à ce qui est connu chez les bactéries à gram positif (*Bacillus subtilis*).

Le clonage de l'opéron *men* de *Bacillus subtilis* chez *L. lactis* peut donc favoriser la respiration chez ce dernier.

L'opéron *menFBytxMmenBEC* comprend cinq gènes (Bacillus Subtilis and others gram positive bacteria, Ed. Sonenshein, A.L., Hoch J.A. and Losick R., ASM, W. DC) : *menF* : ménaquinone-spécifique 2-ketoglutarate déshydrogénase, numéro d'accès SWISS-PROT 23973

*menD* : 2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase, numéro d'accès SWISS-PROT 23970

*menB* : 1,4-dihydroxy-2-naphtoic acid synthase, numéro d'accès SWISS-PROT 23966

5   *menE* : o-succinylbenzoic acid coenzyme A synthetase, numéro d'accès SWISS-PROT 23971

*menC* : o-succinylbenzoic acid synthase, pas de numéro d'accès SWISS-PROT.

Les gènes sont amplifiés par PCR à partir de  
10 la souche 168 [ANAGNOSTOPOULOS et al., J. Bacteriol. 81 : 741-747, (1961)] en utilisant les amorces permettant d'obtenir la séquence codante des gènes avec le promoteur et son terminator.

Amorce sens :

15   5' GTACTGCTGCCATCAGCCC 3'

Amorce antisens :

5' CCACGTCCGTGACGAATACTCCGC 3'

Le fragment d'environ 8 kilobases est cloné dans un plasmide multicopie du type pIL253 (SIMON et al. Biochimie 559-566 1988). La fonctionnalité des gènes est déterminée par complémentation de mutants *men* chez *B. subtilis* [MILLER et al., J. Bacteriol., 170 : 2735-2741, (1988)]. La production de quinone est déterminée selon la procédure de MORISHITA et al. [J. Diary. Sci. 82 : 1879-1903, (1999)].

#### **EXEMPLE 4 : ISOLEMENT DES SOUCHES MUTANTES DE *L. LACTIS* AYANT UNE MEILLEURE CAPACITE DE RESPIRER.**

La capacité de respirer est caractérisée par la présence d'hème dans la cellule. Le gène codant la catalase d'une souche de *Bacillus subtilis* a été précédemment cloné dans *L. lactis* (demande PCT/FR00/00885 aux noms de l'INRA et du CEA ; Inventeurs BRAVARD et DUWAT). La catalase a besoin de l'hème pour son activité. Dans la souche de *L. lactis* contenant le gène cloné de la catalase, un outil de transposition, le pGhost9 :ISS1 (Demande PCT WO 93/18164) est introduit. Une mutagenèse

est effectuée et les mutants issus de la mutagenèse sont ciblés pour leur activité catalase en présence d'un faible quantité d'hémine. Les colonies démontrant une forte activité catalase sont sélectionnées. La mutation 5 responsable de l'augmentation de l'activité catalase est identifiée par des techniques connues par l'homme de l'Art, par exemple, selon la procédure de MAGUIN et al., [J. Bacteriol., 178 : 931-935, (1996)]. L'activité respiratoire est testée pour toutes souches mutantes 10 ayant une activité catalase augmentée par rapport à la souche sauvage. Parmi les souches mutantes, celles présentant une respiration plus efficace, peuvent être identifiées par une augmentation de biomasse, pH final élevé, et/ou une respiration en présence d'une quantité 15 plus faible d'hémine. Des mutants seront reconstruits, et/ou le plasmide contenant la catalase peut être éliminé.

**EXEMPLE 5 : OBTENTION D'UNE SOUCHE DE *L. LACTIS* DONT LE METABOLISME EST DETOURNE VERS LA RESPIRATION.**

20 Les enzymes qui catalysent la dégradation des sucres pour la production d'énergie sont sous contrôle de régulateurs. Le régulateur CcpA régule l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques, y compris la phosphofructokinase, la pyruvate kinase, et la L-lactate 25 déshydrogénase. Un mutant *ccpA*, caractérisé en conditions fermentaires, produit une quantité réduite de lactate, mais une quantité plus importante en acétate et en éthanol, ce qui confirme le rôle régulateur de CcpA [LUESINK et al., Molecular Microbiology 30 :789-798, 30 (1998)]. Aucun travail auparavant ne décrit le comportement d'un mutant *ccpA* des bactéries lactiques en conditions de respiration. Les Inventeurs ont émis l'hypothèse qu'un mutant *ccpA* pourrait adopter un métabolisme respiratoire dès le démarrage de la culture, 35 améliorant ainsi l'acquisition de biomasse.

La capacité de respirer d'une souche portant une mutation dans le gène *ccpA* est testée. Des mutants *ccpA* sont obtenus soit par un remplacement de gène [LUESINK et al., Mol. Microbiol. 30 :789-798, (1998)], soit par insertion de transposon.

La souche utilisée dans cet exemple (décrise par ALEKSANDRZAK et al., Food Biotechnology 17 :61-66, 2000) contient un gène *ccpA* inactivé par l'insertion d'un transposon, (mais il est probable que tout mutant de *ccpA* donne lieu à des résultats semblables). La croissance et la biomasse finale sont déterminées dans du milieu M17 plus glucose (1%) ou du milieu BHI plus glucose (1%), et contenant ou non de l'hémine (10 µg/ml) et aérés ou non-aérés. Les inoculums sont préparés dans du M17 glucose.

Les résultats montrant la capacité respiratoire du mutant par rapport à la souche sauvage sont illustrés par le Tableau II ci-dessous, et par la Figure 1. Ces données indiquent que le mutant *ccpA* présente en fin de culture une biomasse et un pH supérieurs à la souche sauvage.

TABLEAU II

Souche	Conditions de croissance	Densité optique A 600 (biomasse)		pH final	
		M17	BHI	M17	BHI
<i>ccpA</i> (dérivé de la souche IL1403)	sans aération	2,3	ND	5,2	ND
	aération sans hémine	2,8	2,7	5,2	4,2
	aération plus hémine	3,6	5	5,6	5,3
IL1403 (sauvage)	sans aération	2,3	ND	5,2	ND
	aération sans hémine	2,6	1,5	5,2	4,2
	aération plus hémine	3,2	3,9	5,4	4,5

ND : non déterminé

La Figure 1 représente la croissance du mutant *ccpA*, par rapport à celle de la souche sauvage IL1403, en milieu BHI contenant 1% de glucose, et en conditions d'aération, en présence ou en absence d'hémine.

Symboles : ■, *ccpA* + hémine ; □, *ccpA* sans hémine ; ▲, IL1403 + hémine ; △, IL1403 sans hémine.

Pour la préparation de levains, le gène *ccpA* peut également être placé sous contrôle d'un promoteur inductible. La culture des bactéries en vue de la

préparation du levain est effectuée en conditions n'induisant pas le promoteur, et *ccpA* n'est pas exprimé. L'utilisation du levain peut s'effectuer dans des conditions induisant le promoteur, et permettant ainsi la 5 restauration de l'expression de *ccpA*, produisant une souche ayant des activités équivalentes à celles de la souche sauvage.

## REVENDICATIONS

1) Bactérie lactique recombinante modifiée génétiquement afin de lui conférer un métabolisme respiratoire, ou d'activer ledit métabolisme.

5           2) Bactérie lactique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a subi au moins une modification génétique consistant en l'addition d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire ou favorisant ledit  
10          métabolisme.

15          3) Bactérie lactique selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle a subi au moins une modification résultant en la surexpression d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire et/ou une modification résultant en l'activation d'au moins une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire ou favorisant ledit métabolisme.

20          4) Bactérie lactique selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle a subi au moins une modification résultant en l'inactivation totale ou partielle, d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme fermentaire ou favorisant ledit métabolisme, et/ou au moins une modification résultant en la sous-expression, d'au moins un gène codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme fermentaire ou favorisant ledit métabolisme.

25          5) Bactérie lactique selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit gène est choisi parmi :  
30              - les gènes codant pour des protéines de la voie de biosynthèse de l'hème ;  
            - les gènes codant pour des protéines de la voie de biosynthèse des cytochromes ;  
            - les gènes codant pour des protéines du cycle  
35          de Krebs.

6) Bactérie lactique selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit gène est choisi parmi :

- des gènes régulateurs des voies métaboliques favorisant la voie respiratoire ;

5 - des enzymes de la voie de biosynthèse des cytochromes ;  
- des gènes codant pour des protéines héminiques.

7) Bactérie lactique selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit gène est choisi parmi le 10 gène *ccpA* et le gène *gls24*.

8) Bactérie lactique selon une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les bactéries des genres *Lactococcus*, 15 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, ou *Enterococcus*.

9) Bactérie lactique selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche de l'espèce *Lactococcus* ou *Streptococcus* 20 transformée par au moins un gène codant pour une protéine de la voie de biosynthèse de l'hème.

10) Procédé de culture bactérienne, caractérisé en ce qu'il comprend la culture d'au moins une souche de bactérie lactique selon une quelconque des 25 revendications 1 à 9, en conditions permettant l'induction d'un métabolisme respiratoire chez ladite souche.

11) Procédé de culture selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre pour la 30 production d'un levain lactique, et qu'il comprend la récolte des bactéries à l'issue de ladite culture.

12) Levain lactique comprenant au moins une souche de bactérie lactique transformée selon une quelconque des revendications 1 à 9.

35 13) Procédé de préparation d'un produit fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend

l'ensemencement d'un milieu à fermenter à l'aide d'un levain lactique selon la revendication 12.

14) Utilisation d'un levain lactique selon la revendication 12 pour la préparation d'un produit  
5 fermenté.

15) A partir d'un levain lactique recombinant, ayant les propriétés de respiration selon les revendications 1 à 9, l'introduction d'un gène codant une protéine d'intérêt quelconque.

10 16) Utilisation de la souche décrite dans la revendication 15 sous conditions de respiration pour la production de ladite protéine hétérologue.

#### ABREGE DESCRIPTIF

L'invention concerne des bactéries lactiques auxquelles on a conféré un métabolisme respiratoire, notamment par des modifications génétiques, tel que l'expression d'au moins un gène, soit hétérologue soit homologue, codant pour une protéine intervenant dans ledit métabolisme respiratoire, est altérée.

Lesdites bactéries sont utilisables notamment pour la production de levains lactiques.